

氏 名	佐 藤 博 俊
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3302 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	外生菌根菌オニグチ属菌における隠蔽種の探索と宿主特異性の解明 —DNA塩基配列の情報を用いて—

論文調査委員	(主 査) 教 授 戸 部 博 教 授 永 田 俊 准教授 永 益 英 敏
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

本研究では、外生菌根菌の隠蔽種を効率的に識別する手法を開発すること、外生菌根菌の真の宿主特異性を明らかにすることを目的とした。本研究では、宿主特異性が低いとされる外生菌根菌オニグチ属菌を研究材料に用いて解析を行った。

日本と台湾の地域から、オニグチ属菌の子実体サンプルを採集し、その核・ミトコンドリア遺伝子のDNA塩基配列を解読した。遺伝様式の異なるこれらの遺伝子情報の双方で支持されるDNAタイプを調べることで、オニグチ属菌の隠蔽種の網羅的探索を行った。その結果、これまで4つの記載種が知られていたこの属で、合計14個ものDNAタイプが識別され、この属には隠蔽種が多数存在している可能性が強く示唆された。また、オニグチ属菌の菌根サンプルを採集し、菌根に含まれる菌・宿主植物両方のDNA塩基配列を解読することで、その宿主樹種を決定した。この結果、一つのDNAタイプ(DNAタイプ3)のみがアカマツとブナ科樹種の双方を、他のDNAタイプはブナ科樹種のみを宿主としていたことが示された。この結果から、この菌では隠蔽種が混同されていたために、その宿主特異性が過小評価されていたという仮説が支持された。

また、DNAタイプの間で互いに生殖的隔離があるかどうかを集団遺伝学的解析によって検証した。京都市の吉田山からオニグチ属菌の子実体を採集し、子実体のミトコンドリアDNAの塩基配列に基づいてDNAタイプを決定した。その結果、吉田山には3つのDNAタイプ(DNAタイプ1,3,4)が高い割合で集団中に存在していることが分かった。これらのDNAタイプに対して、3つの核遺伝子で、CAPSマーカーによる解析を行った。この結果、異なるDNAタイプ間には、ヘテロ接合体が1つも検出されなかった。また、同一のDNAタイプ内では、それぞれの遺伝子型の頻度はハーディ・ワインベルク平衡から期待される値からずれていないことが分かった。以上のことから、これらのDNAタイプは互いに遺伝子交流のない独立した生物学的種(隠蔽種)であることが証明された。

さらに、複数の樹種が共存する吉田山の中で、オニグチ属菌の隠蔽種間で宿主特異性に関する分化が見られるかどうかについて調べた。まず、GPSを用いて子実体発生地点の位置情報を取得し、各子実体の10m以内の範囲に生育する外生菌根性の樹種の構成を調べた。また、DNAタイプごとの宿主樹種の構成比を調べるため、オニグチ属菌の菌根サンプルの分子解析を行った。その結果、DNAタイプ1はコナラの分布、DNAタイプ3はアカマツの分布、そしてDNAタイプ4はツブラジイの分布とそれぞれ正の相関性が見られた。宿主樹種の構成では、DNAタイプ1と4はブナ科樹種のみを宿主としており、DNAタイプ3はアカマツとブナ科樹種を宿主としていた。その中で、DNAタイプ1はコナラを、DNAタイプ3はアカマツを宿主としている割合が有意に高かった。これらの結果から、DNAタイプ1はコナラに対して宿主選好性がある隠蔽種、DNAタイプ3はアカマツに対して強い宿主選好性がある隠蔽種、DNAタイプ4はツブラジイの生育する環境に選好性がある隠蔽種であることが示唆された。

本研究の結果、本研究で用いた分子手法によって、外生菌根菌の隠蔽種を効率よく認識・識別することができ、これまで認識されていなかった高い宿主特異性をもつ外生菌根菌を新たに発見できることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

形態形質が単純なキノコ類では、隠蔽種、つまり形態的には区別が付きにくい互いに生殖的に隔離している種が多数存在しているものと考えられる。植物と相利共生するキノコ類である外生菌根菌はその宿主樹種に対する特異性は一般的に低いとされている。しかし、キノコ類では隠蔽種が多数存在しているため、外生菌根菌ではその宿主特異性は正しく評価されていない可能性があるものと思われる。

本論文では、外生菌根菌オニグチ属菌において、核遺伝子とミトコンドリア遺伝子のDNA塩基配列情報を活用して、その隠蔽種の網羅的探索を行い、その結果、記載種が4種しか知られていないこの属に少なくとも14個のDNAタイプ（隠蔽種の候補）があることを明らかにした。また、このうち3つのDNAタイプについては、京都市の吉田山において、共優性遺伝マーカーを用いた集団遺伝学的な解析を行うことによって、互いに生殖的に隔離されている生物学的種（隠蔽種）であることを実証している。これらの成果は、人工交配実験の難しい外生菌根菌において、簡便かつ適切に隠蔽種を探索・識別する手法を開発したという点において画期的である。また、これらの研究では、発生時期が限られていてサンプル数の確保が難しいキノコ類の子実体を十分数集めたという点も評価できるものである。他にも、DNA塩基配列の解読のために新たにPCRプライマーを多数開発したり、共優性遺伝マーカーの開発を行ったりした点において、随所に工夫点が見られる。また、本論文では、オニグチ属菌の菌根に含まれる菌・宿主植物双方のDNA塩基配列を解読することによって、オニグチ属菌のDNAタイプごとの宿主樹種を調べている。この結果、複数の地域に由来する14個のDNAタイプの中で、わずか1つだけがアカマツとブナ科樹種を宿主としており、それ以外のものはすべてブナ科樹種のみを宿主としていることを示した。さらに、同所的に3つのDNAタイプが共存しており、アカマツやブナ科樹種が共存している吉田山でDNAタイプ間の宿主樹種構成を比較したところ、1つのDNAタイプのみがアカマツとブナ科樹種のみを宿主としており、2つはブナ科樹種のみを宿主としている傾向が得られた。しかし、この研究で、アカマツも宿主としているDNAタイプは、ただ単に宿主特異性が低いだけでなく、アカマツに対して強い選好性があることが示された。このことは、このDNAタイプも実質的に宿主特異性をもっていることを示しているものと考えられる。これらの結果は、従来、宿主特性が低いとされていたオニグチ属菌では、その隠蔽種が混同されていたために宿主特異性が過小評価されていたことを示している。また、この属では近縁種間においても、明確な宿主特異性の違いが存在することを示している。これらの結果は、従来の外生菌根菌の宿主特異性に関する概念を覆しうるものであり、その点において高い評価をしている。また、本研究で、菌根を分子解析するにあたって随所に工夫点が見られる。菌根は菌類と植物双方のDNAを含んでおり、それらの含有量は少なく、土壌によるコンタミネーションの影響もあるため、その分子解析は非常に難しい。本研究においては、新たに特異的なPCRプライマーを開発し、かつ微量のDNAを効果的に増幅させる手法を独自に開発したという点は高く評価できる。

以上のことから、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。論文内容とそれに関連した試問の結果、合格と認めた。